

流式图像技术在赤潮监测中的应用

骆庭伟^{1,2*}, 谢杰镇^{1,2}, 戴君伟¹, 高越¹

(1. 近海海洋环境科学国家重点实验室(厦门大学), 2. 厦门大学海洋微生物与地球圈层研究所, 福建 厦门 361102)

摘要: 赤潮是我国近海常见的重要灾害. 建立赤潮生物现场监测技术, 是赤潮预警预报和防治控制的基础. 将流式细胞分析技术与显微成像分析技术结合起来, 建立了赤潮生物流式图像监测仪器. 建立赤潮生物专家识别数据库, 对于目标赤潮生物的认识准确率达到 82.52%~99.02%, 定量准确率达到 80% 以上. 统计分析结果显示, 赤潮生物流式图像监测仪器与显微镜方法具有相似的精密度, 90.00% 以上的分析结果具有一致性. 与显微镜方法相比, 赤潮生物流式图像监测仪器具有自动化程度高, 分析速度快, 无需人为干预等优点, 为赤潮生物的监测提供了新的技术手段.

关键词: 流式图像; 显微镜; 赤潮生物; 现场监测

中图分类号: P 714+.5

文献标志码: A

文章编号: 0438-0479(2014)06-0834-06

赤潮是指海水中的某些浮游生物, 例如浮游细菌、浮游植物或者原生动物, 在特定的环境条件下, 爆发性增殖或高度聚集而引起水体变色的海洋生态现象^[1]. 赤潮生物的爆发性增殖, 打破了海域生态系统的平衡, 已成为我国近海常见的重要灾害之一; 从 20 世纪 70 年代以来, 我国赤潮发生频率以每 10 年增加 3 倍的速度上升, 不仅造成了重大的经济损失, 而且对海洋生态环境、公众健康构成了严重威胁^[2-3].

赤潮生物现场监测是赤潮预警预报和防治控制的基础^[4]. 然而, 受制于监测手段, 赤潮生物现场监测, 往往只对水文气象和理化因子进行监测, 而对于赤潮生物的发生发展动态, 缺乏理想的监测手段. 本文介绍的赤潮生物流式图像监测仪器(下文简称为流式图像系统), 针对“赤潮”现象最突出的特点——细胞数量在短时间内剧烈变化, 将流式细胞分析技术与显微成像分析技术结合起来, 并针对我国近海常见的赤潮生物建立专家识别数据库, 实现对目标赤潮生物自动识别与快速定量.

1 系统设计

流式图像系统在硬件上由流路系统、光路系统、

图像系统、荧光系统以及控制电路组成^[5-6](图 1), 在软件上包括系统软件和专家识别数据库.

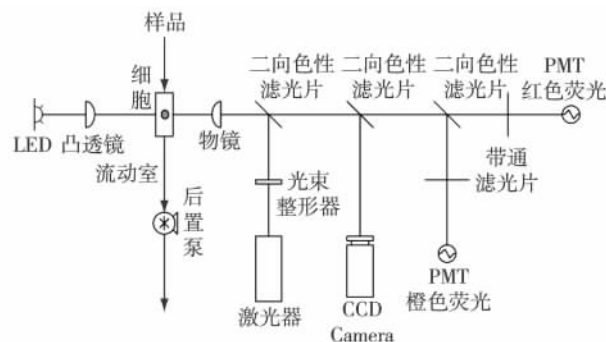


图 1 流式图像系统工作原理示意图

Fig 1 Schematic diagram of the flow imaging system

在流式图像系统的分析过程中, 赤潮生物在流路系统中的后置蠕动泵的驱动下, 平稳到达流动室, 而不至于对细胞造成损伤. 在流动室中, 一方面, 赤潮生物被激光激发, 产生各种荧光信号, 并在光路系统的处理下, 对叶绿素荧光信号和藻红素荧光信号进行检测; 另一方面, 流动室中的赤潮生物受到 LED 的照射, 经过物镜的放大处理, 采集得到清晰的图像信息. 所有的荧光信号和图像信息都被传输到赤潮生物专家识别数据库中, 并根据其特征进行分类识别^[7-8], 实现目标赤潮生物现场自动识别与快速定量, 并在系统软件中展示出来.

在流式图像系统的系统软件中, 提供了 3 种不同的工作模式, 分别适用于不同的应用需求: 1) 自动分析模式, 2) 集成控制模式, 3) 数据回顾模式. 自动分析模式主要用于实验室分析, 在自动分析模式下, 仪

收稿日期: 2013-12-13

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863)项目(2012AA092002, 2007AA092001-9); 上海市科学技术委员会科研计划项目(11dz1204703)

* 通信作者: luo1979@xmu.edu.cn

器将根据定义的分析条件,自动对样品进行分析,并将结果按照时间顺序保存在数据库中.除了实验室的分析工作外,流式图像系统开发的集成控制模式,还可以根据定义好的通讯指令,按照远程控制系统的要求,在无人值守的情况下,自动进行样品的分析、管道的清洗以及数据的传输,实现自动化监测.而在数据回顾模式下,流式图像系统可以读取保存的历史数据,重现赤潮生物的整个生消过程.

2 材料与方法

2.1 材料

实验采用的赤潮生物为海洋原甲藻(*Prorocentrum micans*)、亚历山大藻(*Alexandrium* sp.)、中肋骨条藻(*Skeletonema costatum*)、窄隙角毛藻(*Chaetoceros affinis*)以及辐射圆筛藻(*Coscinodiscus radiatus*)由国家海洋环境监测中心提供;赤潮异湾藻(*Heterosigma akashiwo*)、血红哈卡藻(*Akashiwo sanguinea*)、利马原甲藻(*Prorocentrum lima*)、圆海链藻(*Thalassiosira rotula*)、布氏双尾藻(*Ditylum brightwellii*)、拟菱形藻(*Pseudo-nitzschia* sp.)、米氏凯伦藻(*Karenia mikimotoi*)和东海原甲藻(*Prorocentrum donghaiense*)由厦门大学海洋微生物保种中心和中国海洋大学海洋生物遗传育种研究室提供.

2.2 方法

按照国家标准《海洋监测规范第7部分:近海污染生态调查和生物监测》^[9]的规定,利用普通光学显微镜对赤潮生物进行鉴定,并统计其丰度^[9].同时使用流式图像系统对同一个样品进行分析,比较2种方法的检测结果.

2.2.1 识别准确率

流式图像系统在对赤潮生物进行检测的同时,会对赤潮生物进行自动识别,并保存赤潮生物的原始图像信息.人工对原始图像信息进行辨别,每个赤潮生物测定10次,计算得到目标赤潮生物的识别准确率:

$$R = n_1/n_2 \times 100\%, \quad (1)$$

式中: R 为流式图像系统的识别准确率, n_1 为流式图像系统准确识别出来的图像数量, n_2 为流式图像系统检测的所有图像数量.

2.2.2 定量准确率

定量准确率是指对于某一样品,流式图像系统检测得到的目标赤潮生物丰度与显微镜法检测得到的丰度相比较,所能达到的准确率.定量准确率的计算

公式如下:

$$Q = \overline{C}_1/\overline{C}_2 \times 100\%, (\overline{C}_1 < \overline{C}_2), \quad (2)$$

$$Q = \overline{C}_2/\overline{C}_1 \times 100\%, (\overline{C}_1 > \overline{C}_2), \quad (3)$$

式中: Q 为流式图像系统的定量准确率; \overline{C}_1 为显微镜法检测得到的目标赤潮生物丰度,是重复5次的平均值,单位: mL^{-1} ; \overline{C}_2 为流式图像系统检测得到的目标赤潮生物丰度,是重复5次的平均值,单位: mL^{-1} .

3 结果与讨论

3.1 粒径检测准确性的验证

使用流式图像系统对10 μm Flow Check™ 标准荧光小球(Beckman Coulter, USA)进行分析.这些标准荧光小球在仪器的检测图谱上形成了2个峰值(图2).其中,第1个峰值中的标准荧光小球,其图像信息比较清晰(图2-a),粒径为 $(10.01 \pm 0.24) \mu\text{m}$,与标准荧光小球的真实值非常接近;而第2个峰值中的标准荧光小球,其图像信息就相对比较模糊,出现了重影现象(图2-b),这主要是由于物镜的景深比较浅造成的.

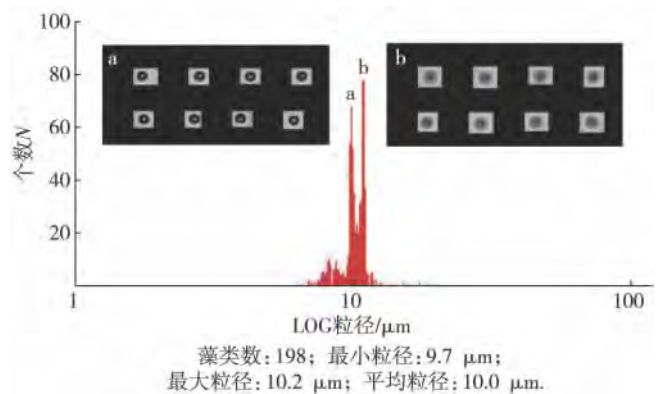


图2 标准荧光小球(10 μm)
在流式图像系统的数量-粒径关系图

Fig. 2 The relationship between quantity and diameter of 10 μm beads analyzed by the flow imaging system

3.2 识别准确率的验证

赤潮生物专家识别数据库的识别效率将直接影响到流式图像系统的检测结果,也因此,我们首先对赤潮生物专家识别数据库的识别效率进行检验.赤潮生物专家识别数据库的识别效率,主要通过识别准确率来评价,即仪器能够准确识别的粒子数占所有识别出来的粒子数的比例.在本次实验中,首先对从现场分离纯化的赤潮生物培养液进行鉴定^[10],然后用赤潮生物培养液,模拟现场环境,再用流式图像系统对其

进行检测. 每个样品检测 10 次, 每次统计 100~200 个图像信息, 计算得到目标赤潮生物在不同环境中的识别准确率(表 1).

由表 1 可知, 对于纯种单细胞赤潮生物, 如亚历山大藻和海洋原甲藻, 流式图像系统识别准确率可达 98% 以上; 而对于群体生活的赤潮生物, 由于群体形态结构多变, 在一定程度上影响了该系统的识别准确率, 特别是中肋骨条藻, 其识别准确率降为 88.00%. 此外, 海水中的杂质及泥沙, 也在一定程度上影响赤潮生物的识别准确率, 特别是高浓度的泥沙悬浮物, 对于该系统的识别准确率有较大的影响.

3.3 定量准确率的比对

显微镜方法是目前我国赤潮生物监测中最常用的方法. 流式图像系统的定量准确率, 主要是与国家标准《海洋监测规范第 7 部分: 近海污染生态调查和生物监测》^[9] 中规定的显微镜法比较, 同时对同一个样品进行检测, 比较 2 种方法所得到的检测结果的偏差.

在本次实验中, 重点对亚历山大藻和海洋原甲藻的整个生长过程进行检测(图 3), 比较了在不同生长时期, 流式图像系统的检测结果与显微镜法的吻合程度.

在亚历山大藻和海洋原甲藻的培养过程中, 流式图像系统和显微镜法, 都能够较好地展示其生长过程, 二者表现出一致性(图 3). 其中, 亚历山大藻培养过程中, 流式图像系统和显微镜法的吻合相对更好一些. 而海洋原甲藻在培养过程的前期, 吻合得比较好, 而到了培养后期, 其偏差相对比较大. 分析其原因, 可

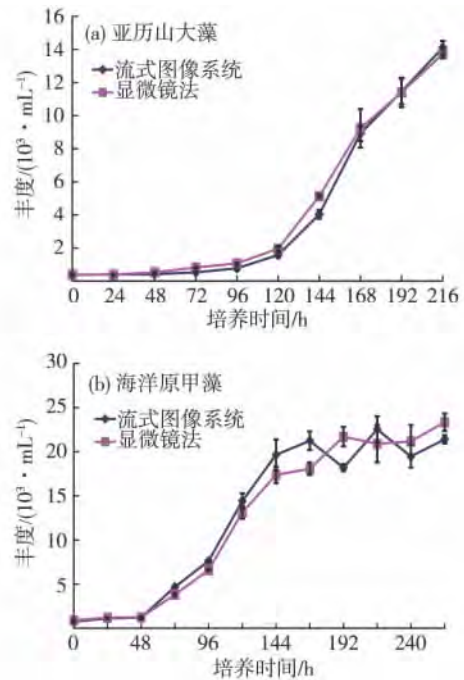


图 3 流式图像系统与显微镜法对赤潮生物生长曲线的检测结果比较

Fig. 3 The grow curves of different algae species detected by the flow imaging system and the microscopy

能是由于海洋原甲藻到培养后期, 其细胞丰度比较大, 达到 $2.33 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$, 在流式图像系统的分析过程中, 藻类细胞比较容易产生沉淀, 导致样品的不均匀性, 进而造成 2 种方法检测结果的差异.

此外, 还比较了其他 10 种赤潮生物, 结果显示, 流式图像系统对于这 10 种赤潮生物的定量准确率均在 80% 以上.

表 1 流式图像系统对不同种类藻类的识别准确率

Tab. 1 The accuracy of algae recognized by the flow imaging system %

类别	样品名称	识别准确率	
		平均值	范围
纯种藻	亚历山大藻	98.29	97.20~99.09
	窄隙角毛藻	96.77	95.58~97.50
	辐射圆筛藻	98.31	95.51~98.75
	海洋原甲藻	98.72	98.11~99.25
	中肋骨条藻	88.00	85.71~89.75
非纯种藻	中肋骨条藻+现场海水	82.52	80.43~84.55
	亚历山大藻+现场海水	96.56	95.87~97.25
	亚历山大藻+现场海水+泥沙悬浮物	86.98	85.00~88.52
	海洋原甲藻+现场海水	99.02	98.48~99.49

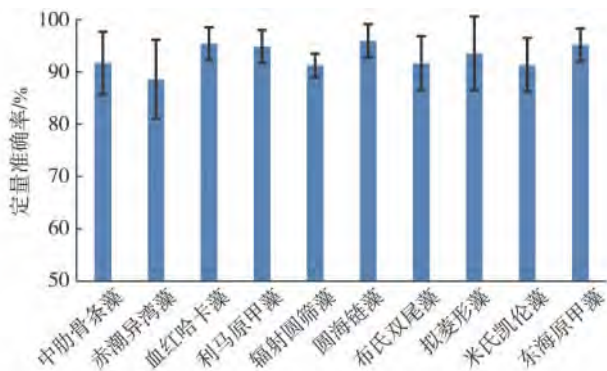


图 4 流式图像系统对于不同赤潮生物的定量准确率比较
Fig. 4 The reorganization accuracy of the flow imaging system for ten different algae species

3.4 精密度比较

在对流式图像系统的定量准确率进行验证的同时,我们也比较了 2 种方法(流式图像系统与显微镜法)之间精密度的差异.精密度使用相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)来表示,一般来说, RSD 越小,表示测定值之间的接近程度越好,即精密度越好.

在培养实验中,对于亚历山大藻,流式图像系统的 RSD 范围:1.99%~13.07%,均值为 6.85%;显微镜法的 RSD 范围:2.90%~13.68%,均值为 6.96%(表 2).对于海洋原甲藻,流式图像系统的 RSD 范围:1.11%~14.06%,均值为 5.75%;显微镜法的 RSD 范围:1.89%~10.10%,均值为 5.58%(表 3).2 组实验数据表明,流式图像系统和显微镜法的精密度

相近.

3.5 流式图像系统与显微镜法的显著性差异检验

对流式图像系统和显微镜法测定样品的数据结果首先采用 Dixon 法进行异常数据的检验和剔除,再对 2 种方法的测定结果进行 *t* 检验.*t* 检验结果总结于表 4 中.

t 检验的结果表明,流式图像系统对于亚历山大藻的测定结果中,有 90.00%与显微镜法(国标法)不具有显著性差异;对于海洋原甲藻,有 91.67%的测定结果与显微镜法不具有显著性差异.说明流式图像系统与显微镜法,在大部分检测结果不存在系统误差,可以在一定程度上替代显微镜法的检测工作.

3.6 流式图像系统在舟山海域的初步应用

为验证流式图像系统在现场应用的可靠性,流式图像系统于 2013 年 9 月初和 10 月底 2 次搭载“海监 47 号”船,在浙江舟山嵊泗海域进行示范性应用.在 2 次示范性应用过程中,流式图像系统能够根据“赤潮监测与预警集成示范系统”的指令,进行现场海水样品的自动化分析,在 1 h 内完成进样、分析、清洗、数据上传等一系列工作.

在 2 次示范性应用过程中,流式图像系统在浙江舟山嵊泗海域的大部分站位中均检测出中肋骨条藻,表明中肋骨条藻是浙江舟山嵊泗海域主要的赤潮生物,即使是在温度较低的秋冬季节,在部分站位其丰度仍然可以达到 $10^4 L^{-1}$ 的数量级,具有较高的赤潮发生风险.这与国家海洋监测中心发布的《赤潮监控区养

表 2 流式图像系统和显微镜法对亚历山大藻测定精度比较

Tab. 2 The measurement accuracy of the flow imaging system and microscopy for *Alexandrium* sp.

培养时间/ h	流式图像系统			显微镜法		
	均值/mL ⁻¹	SD/mL ⁻¹	RSD/%	均值/mL ⁻¹	SD/mL ⁻¹	RSD/%
0	366	36	9.88	395	29	7.28
24	406	39	9.59	389	25	6.44
48	410	22	5.32	533	33	6.28
72	528	27	5.18	821	73	8.91
96	769	29	3.74	1 072	147	13.68
120	1 581	149	9.43	1 960	146	7.45
144	4 036	101	2.49	5 134	264	5.14
168	8 916	1 166	13.07	9 233	437	4.74
192	11 464	893	7.79	11 405	770	6.75
216	14 115	282	1.99	13 744	398	2.90

表 3 流式图像系统和显微镜法对海洋原甲藻测定精密度比较

Tab. 3 The measurement accuracy of the flow imaging system and microscopy for *P. micans*

培养时间/ h	流式图像系统			显微镜法		
	均值/mL ⁻¹	SD/mL ⁻¹	RSD/%	均值/mL ⁻¹	SD/mL ⁻¹	RSD/%
0	722	38	5.31	886	51	5.76
24	1 115	114	10.21	1 210	58	4.76
48	1 197	168	14.06	1 248	82	6.60
72	4 679	52	1.11	3 812	197	5.17
96	7 636	95	1.25	6 602	125	1.89
120	14 415	863	5.98	13 128	710	5.41
144	19 657	1 717	8.74	17 374	915	5.26
168	21 243	1 039	4.89	18 084	714	3.95
192	18 194	392	2.16	21 705	1 103	5.08
216	22 530	1 487	6.60	20 905	2 112	10.10
240	19 479	1 260	6.47	21 170	1 850	8.74
288	21 412	466	2.18	23 345	991	4.25

表 4 流式图像系统和显微镜法的异常值及显著性差异检验结果

Tab. 4 Outliers testing and significance testing of data from the flow imaging system and microscopy

样品名称	数据总量	Dixon 检验 异常数据量	无显著性差 异数据比例 ($p>0.05$)/%
海洋原甲藻	60	0	91.67
亚历山大藻	50	1	90.00

殖环境质量通报》(2013 年第 10 期、第 11 期、第 12 期)^[11-13]的结果相符.此外,东海原甲藻、圆海链藻也在零星站位中检出.

4 结 论

相比于海洋化学或者海洋物理,海洋生物的现场监测仪器和传感器会匮乏很多.流式图像系统,能够提供赤潮生物监测过程中最为关注的 2 个指标:赤潮生物种类和赤潮生物丰度.与国家标准《海洋监测规范》中规定的显微镜法^[9]相比,流式图像系统具有相似的精密度和准确率,且其可以在无人干预的情况下,自动进行样品的分析与数据的传输,具有较高的自动化程度.如果能够在后续的研究中,进一步解决系统的景深问题,扩充赤潮生物的专家识别数据库,

将提高流式图像系统的实用性,在赤潮生物的现场监测中具有广阔的应用前景.

致谢:感谢国家海洋环境监测中心李洪波博士为本研究提供显微镜方面的技术指导!感谢国家海洋局东海分局和“海监 47 号”船为本项目的现场示范性应用创造条件.

参考文献:

- [1] 齐雨藻. 中国沿海赤潮[M]. 北京:科学出版社,2004.
- [2] 周名江,朱明远,张经. 中国赤潮的发生趋势和研究进展[J]. 生命科学,2001,13(2):54-59.
- [3] 苏纪兰. 中国的赤潮研究[J]. 中国科学院院刊,2001,16(5):339-342.
- [4] 李春强,刘志昕,常明进,等. 赤潮监测技术及其应用[J]. 华南热带农业大学学报,2006,12(3):63-68.
- [5] 戴君伟,王博亮,谢杰镇,等. 海洋赤潮生物图像实时采集系统[J]. 高技术通讯,2006,16(12):1316-1320.
- [6] 焦念志. 海洋微型生物生态学[M]. 2 版. 北京:现代教育出版社,2009.
- [7] 谢杰镇,骆庭伟,戴君伟,等. 赤潮藻类流式图像自动分析算法的研究[J]. 计算机科学,2013,40(7):293-296.
- [8] 江涛,王程,王博亮,等. 基于 SVDD 和 SVM 的赤潮藻类识别[J]. 厦门大学学报:自然科学版,2010,49(1):47-51.
- [9] 全国海洋标准化技术委员会. GB 17378. 7—2007 海洋监测规范 第 7 部分:近海污染生态调查和生物监测[S]. 北京:中国标准出版社,2007.

- [10] 郭皓. 中国近海赤潮生物图谱[M]. 北京:海洋出版社,2004.
- [11] 国家海洋环境监测中心. 赤潮监控区养殖环境质量通报[EB/OL]. [2013-12-13]. http://www.mem.gov.cn/res_base/mem_gov_www/upload/article/image/2013_4/11_19/2013-10.pdf.
- [12] 国家海洋环境监测中心. 赤潮监控区养殖环境质量通报[EB/OL]. [2013-12-13]. http://www.mem.gov.cn/res_base/mem_gov_www/upload/article/image/2013_4/11_19/2013-11.pdf.
- [13] 国家海洋环境监测中心. 赤潮监控区养殖环境质量通报[EB/OL]. [2013-12-13]. http://www.mem.gov.cn/res_base/mem_gov_www/upload/article/image/2013_4/11_19/2013-12.pdf.

The Application of Flow Imaging Technology in Harmful Algae Bloom Monitoring

LUO Ting-wei^{1,2*}, XIE Jie-zhen^{1,2}, DAI Jun-wei¹, GAO Yue¹

(1. State Key Laboratory of Marine Environmental Science, Xiamen University,
2. Institute of Marine Microbes and Ecospheres, Xiamen University, Xiamen 361102, China)

Abstract: Harmful algae bloom (HAB) is one of common environmental problems in coastal oceans of China. How to establish red tide monitoring technology is the basis for HAB prediction and prevention. In this study, we developed a flow imaging system that was combined with flow cytometry and microscopy, and established a HAB's expert identification database. With the database, the flow imaging system could distinguish the target algae with the accuracy of 82.52%-99.02%, and the accuracy of automatic quantification was up to 80%. Statistical analysis showed that the flow imaging system had precision similar to the microscopy, and more than 90.00% of the analytical results were consistent. Compared with microscopy, the flow imaging system had higher automation, faster analysis speed, without human intervention, and etc. Therefore, the flow imaging system would provide a new tool for HAB's monitoring in the field.

Key words: flow imaging; microscopy; harmful algae bloom; field monitoring